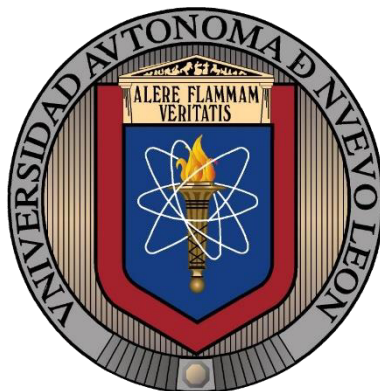


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“COMPARACIÓN DE UN MÉTODO INMEDIATO PARA DETECTAR
BACTERIAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE ENDODONCIA
VERSUS EL MÉTODO DE CULTIVO TRADICIONAL”**

POR

MARISOL ELIZABETH BULNES GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ENDODONCIA**

NOVIEMBRE, 2018

**“COMPARACIÓN DE UN MÉTODO INMEDIATO PARA DETECTAR
BACTERIAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE ENDODONCIA
VERSUS EL MÉTODO DE CULTIVO TRADICIONAL”**

APROBACIÓN DE LA TESIS

**LOS MIEMBROS DEL JURADO ACEPTAMOS LA INVESTIGACIÓN Y
APROBAMOS EL DOCUMENTO QUE AVALA LA MISMA; COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
EN EL ÁREA DE ENDODONCIA.**

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

**DR. SERGIO EDUARDO NAKAGOSHI CEPEDA
PRESIDENTE**

**DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
SECRETARIO**

**DRA. MYRIAM ANGELICA DE LA GARZA RAMOS
VOCAL**

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE ENDODONCIA

“COMPARACIÓN DE UN MÉTODO INMEDIATO PARA DETECTAR
BACTERIAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE ENDODONCIA
VERSUS EL MÉTODO DE CULTIVO TRADICIONAL”.

Comité de Tesis

M.S. Jorge Jaime Flores Treviño
Director de Tesis

M.C.E.E. Idalia Rodríguez Delgado Ph.D.
Co-directora

Asesores

Ph.D. Myriam Angelica De la Garza Ramos
Asesor Metodológico

M.C.O.E.E. Elizabeth Madla Cruz
Asesor Metodológico

Lic. M.C. Guadalupe Ismael Malagón Santiago
Asesor Estadístico

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por todas sus bendiciones, por ser mi guía y por darme la fortaleza y perseverancia en continuar con mis objetivos y sobre llevar cualquier obstáculo o dificultad. Tus tiempos son perfectos; si no es contigo, con quien. A mi esposo, José Eduardo Santos González, por ser mi compañero de locuras, el amor de mi vida, esto lo iniciamos juntos, creíste en mis ideales y mis capacidades, tu apoyo constante hizo que cada día fuera creyendo más en mí y en mis capacidades. “LO LOGRAMOS”.

A mis padres, Bernardo Bulnes García y Elizabeth García Hilton, por estar presentes en todo momento, por escuchar todas mis historias, mis inquietudes, por apoyarme en otro proyecto más, quiero ser la mejor por ustedes, me han enseñado a valorar lo aprendido , a comprometerse y apreciar los frutos de todo los sacrificios, siempre a darlo todo, trabajar duro, buscar dejar un legado a través de nuestro amor, humildad, servicio, responsabilidad y compromiso. LOS AMO.

A mis hermanas Mariana y MariaJosé por escuchar mis locuras, indecisiones, y cualquier cosa que se me venía a la mente, son mi todo, las quiero mucho gracias por apoyarme y seguirme apoyando. Siempre estaré para ustedes.

A mi madrina Esther García, por escuchar cada inquietud y desempañar las ideas que no me permitían ver con claridad mis objetivos, por ayudarme a superar cada reto y aprender junto a mí, por toda su paciencia, amor y motivación y sobre todo por siempre estar presente, siempre dispuesta, siempre mi madrinita.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, sobre todo al Posgrado de Endodoncia, por abrirme sus puertas y haberme permitido desarrollar y perfeccionar mis habilidades.

Al Dr. Jorge Jaime Flores Treviño, coordinador de nuestro posgrado, por impulsarnos siempre a seguir aprendiendo y no conformarnos. A la Dra. Idalia Rodríguez Delgado por hacerme creer que toda idea tiene un potencial en el mundo científico. A la Dra. Elizabeth Madla Cruz por ser la que siempre vio mi proyecto como algo posible, por darme todo su apoyo en desarrollar el proyecto, a pesar de sus miles de actividades siempre tuvo un espacio para mí y te lo agradezco de todo corazón.

Al CONACYT por el apoyo económico para la realización de mis estudios y de este trabajo.

Finalmente agradezco a mis compañeros del posgrado, por cada uno de las aventuras vividas durante este tiempo, son los que me ayudaron a seguir adelante frente todas las adversidades, su motivación, sus risas, discusiones fueron un gran empuje a llegar a donde estamos hoy, gracias por su amistad en todo momento.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE GRÁFICAS	7
NOMENCLATURA	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivos Generales.....	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. ANTECEDENTES.....	14
4.1 Endodoncia	14
4.2 Pulpa Dental	14
4.2.1 Funciones de la pulpa dental	14
4.2.2 Clasificación de los trastornos pulpares	15
4.3 Microbiología	16
4.3.1 Vías de contaminación o infección pulpar.....	16
4.3.2 Infección primaria.....	17
4.3.3 Infección secundaria	17
4.4 Preparación químico-mecánica.....	18
4.5 Desinfección	19
4.6 Método de Identificación Microbiana	22
4.7 Método de Bioluminiscencia	24
4.7.1 ATP	24
4.7.2 Luminómetro MVP ICON	25
5. MÉTODOS.....	28
5.1 Descripción estudio <i>in vitro</i>	28
5.2 Descripción del estudio <i>in vivo</i>	31
6. DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1 Resultados <i>In Vitro</i>	34
7.2 Resultados <i>In Vivo</i>	36
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	41
10. LITERATURA CITADA.....	42
RESUMEN BIOGRÁFICO	48

LISTA DE FIGURAS

Figuras

Página

1. Reacción del ATP.....	25
2. Dispositivo Luminómetro MVP Icon.....	26
3. Escala de limpieza MVP Icon.....	27
4. Dispositivo MVP Icon.....	28
5. Lector de Microplacas.....	28
6. Inoculación Bacteriana.....	29
7. Materiales para Toma de Muestra.....	30
8. Toma de Muestra.....	30
9. Protocolo de Irrigación.....	30
10. Incubación de la muestra Método Tradicional.....	31

LISTA DE GRÁFICAS

Gráficas	Página
1. Gráfica de Resultados de Reproducibilidad <i>In Vitro</i> 1.....	34
2. Gráfica Escala <i>In Vitro</i> 2.....	34
3. Escala Logarítmica <i>In Vitro</i> Gráfica 2.....	35
4. Gráfica de Resultados de Reproducibilidad <i>In Vivo</i> 1.....	36
5. Gráfica Escala <i>In Vivo</i> 2.....	36
6. Escala Logarítmica <i>In Vivo</i> Gráfica 2.....	37

NOMENCLATURA

ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético,
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NiTi	Niquel Titanio
RLUs	Unidades Relativas de Luz

RESUMEN

Nombre: Marisol Elizabeth Bulnes García

Director: M.S. Jorge Jaime Flores Treviño

Co-directora: M.C.E.E. Idalia Rodríguez Delgado Ph.D.

Facultad de Odontología

Universidad Autónoma de Nuevo León

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Introducción: Es primordial como objetivo del tratamiento de conductos radiculares poder tener una completa erradicación de la microflora endodóntica para tener éxito. Sin embargo, los métodos actuales para evaluar las bacterias presentes en una necrosis pulpar o una periodontitis apical no son ampliamente practicados. El trifosfato de adenosina (ATP) es un indicador de células vivas. La lectura del ATP basado en la bioluminiscencia es fácil de realizar y los resultados se pueden obtener en un marco de tiempo clínicamente relevante de 5 minutos. **Objetivo:** Evaluar la sensibilidad de detección del ATP de las bacterias con el uso del Luminómetro *MVP ICON* durante el tratamiento de endodoncia comparado con el método de cultivo tradicional, de muestras de conductos radiculares de pacientes sometidos a tratamientos endodónticos. **Materiales y Métodos:** El estudio se dividió en dos etapas, una in-vitro utilizando 24 dientes unirradiculares donde se les inoculó *E. faecalis* por 24 hrs a 37°C después se procedió a tomar la muestra con dos puntas de papel, se colocaron en el MVP Icon y el cultivo anaeróbico. La lectura se realizó en un lector de placas de 96 pozos. Para el estudio *in vivo* se tomaron de 9 pacientes sometidos a tratamiento de conducto, dos muestras del conducto radicular antes de tomar longitud de trabajo y dos muestras al terminar de instrumentar con Wave One Gold Large 045/.05 y haber realizado el protocolo de irrigación con NaOCl y EDTA, y se sometieron a la lectura de ATP y cultivo anaerobio. **Resultados:** Las condiciones experimentales utilizadas en los estudios *in vitro* e *in vivo* son completamente distintos, obteniendo niveles bajos de concordancia. En cambio en cuanto a los dos métodos utilizados, se demostraron niveles altos de asociación, existiendo una fuerte relación en cuanto a sus resultados cuantitativos, obteniendo en este caso rangos similares de contaminación y desinfección. **Conclusiones:** El método de bioluminiscencia se puede utilizar como una herramienta rápida y eficaz para determinar la presencia de bacterias durante el tratamiento de endodoncia. El uso de este método pudiera ser una herramienta adicional durante el tratamiento para evitar posibles re-infecciones.

ABSTRACT

Name: Marisol Elizabeth Bulnes García

Director: M.S. Jorge Jaime Flores Treviño

Co-director: M.C.E.E. Idalia Rodríguez Delgado Ph.D.

Facultad de Odontología

Universidad Autónoma de Nuevo León

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Introduction: As an objective of root canal treatment it is essential to have a complete eradication of the endodontic microflora to have a successful outcome. However, current methods for evaluating bacteria present in pulpal necrosis or apical periodontitis are not widely practiced. Adenosine triphosphate (ATP) is an indicator of living cells. The reading of the ATP based on bioluminescence is easy to perform and the results can be obtained in a clinically time frame of 5 minutes. **Objective:** To evaluate the detection sensitivity of bacterial ATP with the use of the MVP Icon Luminometer during the endodontic treatment compared to the traditional culture method, of root canal samples of patients undergoing endodontic treatments. **Materials and Methods:** The study was divided into two phases, an in-vitro using 24 uniradicular teeth where they were inoculated *E. faecalis* for 24 hrs at 37°C then proceeded to take the sample with two paper points, they were placed in the MVP ICON and anaerobic culture. The reading was made in a 96-well plate reader. In the *in vivo* study, 9 patients undergoing root canal treatment were taken, two samples of the root canal before taking working length and two samples after finishing with Wave One Gold Large 045/.05 and having performed the irrigation protocol with NaOCl and EDTA, and were subjected to the reading of ATP and anaerobic culture. **Results:** The experimental conditions used in the in vitro and in vivo studies are completely different, obtaining low levels of concordance. On the other hand, in terms of the two methods used, high levels of association were demonstrated, with a strong relationship in terms of their quantitative results, obtaining in this case similar ranges of contamination and disinfection. **Conclusions:** The bioluminescence method can be used as a rapid and effective tool to determine the presence of bacteria during root canal treatment. The use of this device could be an additional method during root canal therapy to avoid possible re-infections.

1. INTRODUCCIÓN

Los objetivos de la terapia endodóntica son la preparación de los conductos radiculares, eliminando de forma mecánica con instrumentos manuales o rotatorios el tejido pulpar ya sea vital o necrótico y sus tejidos remanentes, otorgando una conformación al conducto permitiendo el uso de soluciones irrigantes que permitan el lavado, la disolución del tejido y la lubricación del mismo, para evitar que los microorganismos infecten o re-infecten el sistema de conductos y los tejidos perirradiculares. La eliminación completa de las bacterias se asocia con altas tasas de éxito, sin embargo sabemos que al no ser totalmente eliminadas son el factor principal de fracaso. Actualmente en la práctica clínica se finaliza un tratamiento endodóntico de forma subjetiva observando la presencia de dentina blanca en los instrumentos, identificando algún resto de tejido remanente y otros. La detección de bacterias con métodos como el conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) y la reacción en cadena de la polimerasa consumen tiempo, haciéndolos inviables durante la clínica. Un nuevo método de detección de bacterias es el uso del trifosfato de adenosina (ATP), que es la principal fuente de energía para las funciones celulares en organismos vivos y sirve como un indicador de actividad metabólica en células viables. Este método obtiene resultados de forma precisa y rápida siendo predecible durante su uso en el tratamiento de conductos.

En este estudio se comparó la sensibilidad y efectividad del método de detección del ATP con el Luminómetro *MVP ICON*, versus el método de cultivo tradicional in vitro e in vivo, determinando si esta herramienta puede ser inmediata y efectiva para detectar la posible presencia de bacterias durante el tratamiento de endodoncia.

2. HIPÓTESIS

El uso del MPV ICON es un método ideal para detectar bacterias durante el tratamiento endodental.

Hipótesis nula: El uso del MPV ICON no es un método ideal para detectar bacterias durante el tratamiento endodental.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

Evaluar la sensibilidad del ATP de las bacterias con el uso del Luminómetro *MVP ICON* durante el tratamiento de endodoncia comparado con el método de cultivo tradicional.

3.2 Objetivos Específicos

- Analizar la lectura del ATP durante 2 fases del tratamiento endodóntico.
- Comparar la lectura del ATP con el método de cultivo tradicional para determinar la presencia de bacterias
- Determinar si existe una correlación significativa entre ambos métodos.

4. ANTECEDENTES

4.1 Endodoncia

La endodoncia es una rama de la odontología que se dedica al estudio de la morfología, la fisiología y la patología de la pulpa dental y los tejidos periapicales humanos, así como la prevención y el tratamiento de los trastornos y las lesiones relacionadas con estos tejidos. En última instancia, el objetivo fundamental de la endodoncia consiste en conservar la dentición natural y curar o prevenir la periodontitis apical periradicular (Flemming H et al. 2016; Torabinejad M. 2010; Trope M. 2003).

4.2 Pulpa Dental

La pulpa dental es un tejido blando que ocupa la parte central del diente; está encerrada en un ambiente rígido que comprende tres tejidos mineralizados: esmalte, dentina y cemento. Estas estructuras le dan un fuerte soporte mecánico protegiendo la pulpa del ambiente oral rico en microorganismos (Yu C, Abbot P 2007; Goldberg M et al. 2017).

La pulpa está compuesta principalmente de tejido blando conjuntivo laxo muy vascularizado e innervado, de tipo mesenquimatoso. Está formada principalmente por un 75% de agua y un 25% de matriz orgánica (Torabinejad M. 2010). Dentro de la matriz orgánica encontramos diversas células como los odontoblastos siendo las células productoras de dentina, fibroblastos y fibrocitos que son los encargados de la producción y mantenimiento de la matriz extracelular compuesta por fibras de colágena tipo I (55-60%) y tipo III (40-45%), células madre; macrófagos y células dendríticas como células de defensa y células transitorias que corresponden a los leucocitos. (Gómez 2002; Goldberg M et al. 2017)

4.2.1 Funciones de la pulpa dental

La pulpa dental lleva a cabo cinco funciones (Bammann LL, 2009):

La inductiva donde la pulpa interviene en el inicio y desarrollo de los odontoblastos, una vez formados (Lisis S et al., 2003), inducen a la formación de la dentina y esmalte por medio de la síntesis y secreción de la matriz inorgánica, transportando los componentes inorgánicos a la matriz recién formada y creando condiciones que permitan la mineralización de la matriz (Lesot H, et al., 2001). En la nutritiva por medio de los túbulos dentinarios, la pulpa suministra nutrientes que son esenciales para la formación de dentina e hidratación para mantener su integridad, la defensa se da cuando los odontoblastos son capaces de producir dentina aún después de una lesión, teniendo relación con la presencia de caries, traumatismo o un tratamiento restaurador; esta nueva dentina o también conocida como dentina terciaria y de reparación, se forma gracias a la inducción, la diferenciación y la migración de nuevos odontoblastos a la zona expuesta (Narayanan L et al., 2010); por último la función sensitiva es por la cual a través del sistema nervioso, la pulpa responde a estímulos que pueden llegar al esmalte y la dentina por medio de fibras sensitivas mielínicas que provocan un dolor inmediato y agudo y las fibras amielínicas que se presentan ante un estímulo dando lugar a un dolor más lento y

amortiguado (Bammann LL, 2009).

4.2.2 Clasificación de los trastornos pulpaes

El estado pulpar se puede clasificar en: pulpa normal, pulpitis reversible e irreversible, necrosis pulpar, cuando hay una invasión de bacterias a través del periapice se clasifica como periodontitis apical (Torabinejad M et al., 2010; Grossman L 2004).

En una pieza con la pulpa dental sana no se manifiesta ningún síntoma clínico y responde de manera normal a las pruebas de vitalidad, aunado a esto, no hay signos radiológicos que indiquen alguna infección (Grossman L, 2004).

Al existir una afección mínima a través del esmalte y dentina se presenta una alteración provocando síntomas indicativos de presencia de una inflamación leve del tejido pulpar, eliminando la causa como alguna caries incipiente, la pulpa vuelve a su estado normal (Torabinejad M et al., 2010). Los síntomas son de duración corta, al remover el estímulo el alivio es inmediato, el tratamiento es el sellado de la dentina y esmalte para evitar el aumento de los síntomas y la inflamación completa de la pulpa (Bender I, 2000).

Cuando los síntomas no se eliminan al remover el estímulo y se mantienen el dolor moderado o intenso, a estos signos se les considera como un estado de pulpitis irreversible, la cual se presenta cuando la pulpa llega a un estado de inflamación grave por el daño de gran cantidad de dentina por caries o por la supresión del flujo sanguíneo, o bien, por algún traumatismo (Torabinejad M et al., 2010). Las características pueden incluir dolor agudo al estímulo térmico, dolor persistente (a menudo 30 segundos o más después de la eliminación del estímulo), espontaneidad (dolor no provocado) y dolor referido (AAE, 2013). La pulpitis irreversible puede ser sintomática produciendo un dolor espontáneo y persistente o asintomático el cual no produce ningún signo o síntoma (Mumford J, 1967).

La necrosis pulpar es un diagnóstico clínico que indica la muerte de la pulpa dental, lo que requiere un tratamiento de conductos radiculares (AAE, 2013). Cuando la pulpitis irreversible conduce a una necrosis por licuefacción, se debe a que la pulpa no dispone de una circulación colateral ocasionando que las vénulas y vasos linfáticos aumenten su presión tisular y que terminen colapsándose. La necrosis se retrasa si el exudado que se produce durante una pulpitis irreversible drena a través de la caries o alguna exposición hacia la cavidad oral (Torabinejad M et al., 2010). Si existe un sellado de la pulpitis irreversible impidiendo la salida de la inflamación, se induce una necrosis pulpar rápida (Bender I, 2000).

A la pruebas de sensibilidad la pulpa responde de manera asintomática, pero puede estar asociada a episodios de dolor espontáneo y de molestias en los tejidos periradiculares con la presión de la masticación (AAE, 2013). La necrosis de la pulpa por sí sola no causa periodontitis apical a menos que el conducto esté infectado y que se comunique con el periodonto (Kishen, 2012).

Uno de los objetivos principales del tratamiento endodóntico es eliminar bacterias del sistema de conductos radiculares para tratar o prevenir la periodontitis apical (Kishen, 2012).

La periodontitis apical es una reacción inflamatoria de los tejidos perirradiculares causada por una infección microbiana dentro del conducto radicular (Haaspasalo M et al., 2005). Se manifiesta como una respuesta de defensa del huésped al desafío microbiano dentro del sistema de los conductos radiculares. La infección endodóntica se desarrolla en los conductos como consecuencia de la necrosis de la pulpa a causa de caries, algún traumatismo, o una afección periodontal (Ricucci D, 2008). Se considera una interacción entre los factores microbianos y las defensas del huésped; se produce una inflamación local, y por ende los microorganismos superan la barrera defensiva, causando una infección extrarradicular, presentándose alguna reabsorción de los tejidos duros, destrucción de tejidos periapicales y la formación eventual de lesiones periapicales (Haaspasalo M et al., 2005). El establecimiento de los microorganismos en los tejidos perirradiculares, ya sea adheridos a la superficie externa del ápice en forma de biopelículas son causa de la persistencia de las lesiones de periodontitis apical a pesar del tratamiento endodóntico previo (Tronstand L et al., 2003).

El éxito del tratamiento endodóntico depende de la eliminación efectiva de las biopelículas formadas por la comunidad de microorganismos, sin embargo la eliminación total de los mismos se ha reportado que es complejo, es por ello que se busca reducir sustancialmente la carga microbiana y prevenir la reinfección (Ricucci D, 2008; Torabinejad M et al., 2010). El tratamiento de conductos tiene un alto grado de éxito, los elementos necesarios en el control de la infección endodóntica son la defensa del huésped, la instrumentación y la irrigación, los medicamentos intraconductos utilizados entre citas y la obturación, así como el sellado de la pieza dental (Haaspasalo M et al., 2003). En caso que falle el tratamiento, siempre hay una opción quirúrgica, eliminando la parte infectada por la biopelícula en la zona extrarradicular (Von Arx T, 2011).

4.3 Microbiología

La presencia de microorganismos en la pulpa dental está directamente asociada con el desarrollo de la enfermedad pulpar y periapical.

4.3.1 Vías de contaminación o infección pulpar

El acceso de microorganismos a la estructura pulpar se puede dar básicamente por el acceso a través de los túbulos dentinarios, periodonto, anacoresis y restauraciones defectuosas (Narayanan L et al., 2010; Liébana 2002; Torabinejad M et al., 1990)

- Túbulos dentinarios: esta es la vía más común utilizada por los microorganismos para alcanzar la pulpa después de una lesión cariosa, un traumatismo o durante procedimientos dentales, las bacterias producen ácido invadiendo los túbulos y desmineralizando las paredes de la pieza dental; obtienen su acceso cuando la distancia dentinaria entre el borde de la lesión cariosa y la pulpa es de 0.2 mm (Dahlen G et al., 1991)

- Cavidad expuesta: la exposición directa a la pulpa de origen traumático, o alguna preparación, rompe la barrera física impuesta por las estructuras dentales y deja la pulpa en contacto con el entorno séptico oral (Narayanan L et al., 2010).
- Periodonto: los microorganismos presentes en el surco gingival pueden alcanzar la cámara pulpar a través de la membrana periodontal, utilizando un conducto lateral o el foramen apical como vía. Esta vía se vuelve disponible para los microorganismos durante una profilaxis dental, o cuando hay presencia de bolsas periodontales (Liébana 2002, Dahlen G et al., 1991).
- Anacoresis: se define como la atracción positiva de los microorganismos presentes en la circulación sanguínea hacia los tejidos inflamados o necróticos durante una bacteremia (Torabinejad M et al., 1990). Se requiere una inflamación o necrosis previa de la pulpa para su desarrollo. La detección de microorganismos que no pertenecen a la microbiota normal de la cavidad oral, nos sugiere una infección por esta vía.
- Restauración defectuosa: los estudios han demostrado que la filtración de saliva por restauraciones deficientes, inadecuadas y/o fractura del sellado puede alcanzar el área periapical y provocar una infección en menos de 6 semanas en piezas con tratamiento de endodoncia. (Narayanan L et al., 2010).

4.3.2 Infección primaria

La infección primaria o intrarradicular implica inflamación de la pulpa e infección del conducto radicular después de la invasión de bacterias o subproductos de estas, que al no ser tratada puede provocar eventualmente una inflamación de los tejidos de soporte, es decir, una periodontitis apical. (Provenzano J et. al., 2103).

Las infecciones endodónticas primarias son polimicrobianas, dominadas por bacterias anaerobias (Haaspasalo M et al., 2003); predominan especies de bacterias gramnegativas como *Bacteroides*, *Prophyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema* y *Camphylobacter*, de igual maera se encuentran las bacterias grampositivas como *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Parvimonas*, *Filifactor* y *Actinomyces*. (Rocas I et. al., 2010). Estudios han demostrado la presencia de una media de 10 a 20 especies o filotipos por conducto infectado (Rebeiro A et al., 2011).

4.3.3 Infección secundaria

La infección secundaria o extrarradicular conocida también como infección después del tratamiento previo, ocurre como una re-infección (adquirida o emergente), una infección persistente o una infección recurrente en dientes que han sido previamente tratados (Haaspasalo M et al., 2003). Predominan bacterias anaeróbicas gram-positivas y facultativas, como *Enterococci*, *Streptococci*, *Lactobacilli*, *Actinomyces* y hongos (Wang J et al., 2012), estudios han demostrado la prevalencia de estas especies en dientes con infección intraradicular persistente; en lo particular, se identificó una alta proporción de *Enterococcus faecalis* en casos con periodontitis apical persistente; llegando a provocar inflamación crónica o aguda y destrucción de los tejidos que rodean el periápice con posterior desarrollo de abscesos (Zhang C 2015; Zapata et al., 2008; Love R, 2001).

La microflora bacteriana del conducto radicular está inicialmente dominada por aerobios y anaerobios facultativos, provocando infección dentro del conducto, teniendo una naturaleza polimicrobiana; algunas de las principales bacterias relacionadas con las principales vías de infección de la pulpa son (Liébana, 2002): en traumatismos o caries extensa predominan los *Streptococcus* del grupo *viridans* y *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces naeslundii* que tiene acceso a través de los túbulos dentinarios (Flemming H et. al., 2016). A través del periodonto se encuentran las bacterias grampositivas, *Peptoestreptococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Propionibacterium spp.*, *Rothia dentocariosa* (Díaz P, 2012).

La preparación quimomecánica del conducto radicular contaminado se realiza utilizando agentes antimicrobianos, seguido de una obturación y una restauración coronal, lo que proporciona un resultado favorable al tratamiento endodóntico (Narayan L, 2010).

Sin embargo, las bacterias dentro de las comunidades de las biopelículas son de 10 a 1000 veces más resistentes a agentes antimicrobianos y antibióticos (Oppenheimer-Shaanan et al., 2013; Tay et al., 2015). Ocasionalmente algunas veces, el fracaso del tratamiento debido a una infección intraradicular persistente o secundaria (Nair P, 2006).

Enterococcus faecalis es un microorganismo Gram-positivo, anaerobio facultativo que reside en el tracto gastrointestinal. No obstante, puede causar infecciones potencialmente mortales como endocarditis, bacteriemia, infección del tracto urinario y meningitis (Khalifa et al., 2015). La bacteria *E. faecalis* desempeña un papel importante en la formación de biopelículas bacterianas y, por lo tanto, se considera que las biopelículas de *E. faecalis* son un modelo apropiado para probar nuevos tratamientos antimicrobianos (Meire et al., 2012; Du et al., 2013; Tay et al., 2015; Shlezinger et al., 2016).

A pesar de los distintos estudios que se han realizado para erradicar esta bacteria, las herramientas de hoy en día siguen siendo limitadas (Paganelli et al., 2012). Por estas razones, las biopelículas bacterianas representan un gran desafío al momento de la desinfección en el tratamiento del sistema de conductos, por lo tanto se siguen promoviendo mejoras para poder identificar y desorganizar la estructura de las biopelículas, aumentando el pronóstico del tratamiento. (Kishen, 2012; Meire et al., 2012; Du et al., 2013).

4.4 Preparación químico-mecánica

El objetivo fundamental de la preparación químico-mecánica cumple con la remoción del tejido pulpar y dentina infectada, eliminación de la mayoría de los microorganismos, y la ampliación y conformación de los conductos radiculares antes de la obturación (Paqué F, 2005).

La preparación mecánica se efectúa con la ayuda de instrumentos manuales o rotatorios de distintas aleaciones; hoy en día la endodoncia se ha convertido en una especialidad moderna debido a los recientes avances tecnológicos; actualmente con el uso de los instrumentos rotatorios o reciprocantes a base de aleaciones de níquel titanio. (Plotino et al., 2012).

Recientemente se han introducidos nuevas técnicas para mejorar la preparación de conductos, un nuevo sistema de lima de uso único, conocido como WaveOne Gold (Dentsply Tulsa Dental Especialidades, Tulsa, OK, EE.UU.). Este sistema funciona con un motor especializado que realiza movimientos reciprocantes; basándose en el “Concepto de Fuerzas Balanceadas” propuesto por Roane en 1985, donde explica la importancia de realizar movimientos horarios y anti horarios como técnicas para superar las pronunciadas curvaturas de algunos conductos, disminuyendo el riesgo a la fatiga cíclica causada por fuerzas de tensión y compresión. (Varela-Patiño P et al., 2010). Este sistema disponible en cuatro tamaños: pequeño (tamaño 20/.07 cónico), primario (tamaño 25/.07), medio (tamaño 35/.06) y grande (tamaño 45/.05 cónico). WaveOne Gold combina los avances metalúrgicos del tratamiento térmico de alambre de oro y la técnica original del instrumento alternativo WaveOne. (Elnaghy A, 2016).

Para aumentar el éxito del tratamiento endodóntico, ya que la instrumentación mecánica no puede eliminar todos los restos del tejido de la cámara pulpar y de los conductos (Neelakantan P et al., 2017), es esencial el proceso químico dentro de los conductos radiculares utilizando irrigantes que proporcionarán una remoción de debris dentinario durante la instrumentación, una acción antimicrobiana, la eliminación de tejido orgánico e inorgánico y la lubricación del conducto (Basrani B, 2012).

4.5 Desinfección

Eliminar las bacterias del sistema de conductos es complejo, por ello el debridamiento mecánico es limitado. Estudios han demostrado que sólo el 40%-60% de los casos pueden tener aún presencia de bacterias después de la limpieza y configuración de los conductos radiculares (Paque F et al., 2010).

La efectividad del proceso químico va a depender de la concentración del irrigante antimicrobiano, el área de contacto, y la duración de la interacción entre el irrigante y el material infectado (Boutsoukis C., 2012). Debido a la compleja morfología interna que presentan los conductos radiculares como son: los conductos laterales, deltas, istmos y diferentes ramificaciones es importante realizar una buena limpieza química ya que la instrumentación mecánica tiene algunas limitaciones para localizar estas variantes (Vera J et al., 2012).

El irrigante más utilizado en la endodoncia es el hipoclorito de sodio NaOCl por su capacidad antibacteriana y su gran habilidad para disolver tejido necrótico, vital, componentes orgánicos de la dentina y biopelículas. (Mohammadi Z, 2009). Fue introducido en Francia en 1789, Dakin recomendó esta solución con una concentración de 0.5% para las heridas de los soldados de la I Guerra Mundial. Sin embargo, fue Coolidge quien presentó esta solución como un irrigante endodóntico (Davis J, 2007). Debido a sus características antibacterianas el NaOCl se puede utilizar a diferentes concentraciones desde 0.5% a 6%, a estas concentraciones, es altamente hipertónico y altamente alcalino con un pH de 11 a 13 (Chaugule V et al., 2015; Yamazaki et al., 2010). Tiene fuertes propiedades proteolíticas y oxidativas. Puede disolver el tejido pulpar necrótico y vital; reaccionando con ácidos grasos y aminoácidos en la pulpa dental, lo que produce una licuefacción del tejido orgánico (Estrela C et al., 2002) y

puede matar una amplia gama de patógenos como Gram + y Gram -, hongos y virus. (Becking A, 1991). No obstante tiene características citotóxicas en contacto con tejidos blandos; cuando entra en contacto con el tejido, causa hemólisis y ulceración, inhibe la migración de neutrófilos y daña las células endoteliales y de fibroblastos. (Witton R et al., 2005).

Estudios han comprobado que el NaOCl a mayores concentraciones, es efectivo contra *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*; se ha demostrado que a altas temperaturas aumenta su capacidad para disolver la sustancia orgánica (Gomes B, 2001).

Otro de los irrigantes utilizados para aumentar el éxito del tratamiento son los agentes quelantes, introducidos en la endodoncia por Nygaard-Östby en 1957 como coadyuvante para la preparación de los conductos estrechos y calcificados (Ostby B, 1961; Simon R et al., 2014)

El agente quelante es capaz de unirse a los metales a través de cuatro grupos carboxilato y dos amina. Es un ácido poliaminocarboxílico y un sólido incoloro, soluble en agua, que se usa ampliamente para disolver la cal. (Mohammadi Z et al., 2013). Su utilidad surge debido a su capacidad de secuestrar iones metálicos como Ca^{2+} y Fe^{3+} (Harris D et al., 2007); se produce en forma de varias sales, especialmente EDTA disódico y EDTA disódico cálcico.

El compuesto fue descrito por primera vez en 1935 por Ferdinand Munz, quien preparó el compuesto a partir de etilendiamina y ácido cloroacético (Carolina E et al., 2007)

El EDTA reacciona con los iones de calcio en la dentina y forma quelatos de calcio solubles. Éste, es capaz de descalcificar la dentina a una profundidad de 20-30 μm en 5 minutos (Von der Fehr F et al., 1963). Por lo tanto, el EDTA ablanda químicamente la dentina del conducto radicular y disuelve la capa de debris, además de aumentar la permeabilidad de los túbulos dentinarios. (Haapasalo M et al., 2014; Hulsamann M et al., 2003). Sin embargo, su efecto antibacteriano y su capacidad de disolución de tejido orgánico es limitado, es por ello que no debe de reemplazar al NaOCl como un irrigante, aunque pueden mejorar la capacidad de NaOCl para penetrar en la dentina y aumentar su efecto antibacteriano (Hulsamann M et al., 2003).

Un método recomendado para remover la capa de barrillo dentinario consiste en inundar el conducto radicular con EDTA al 17% por un minuto después de la instrumentación final para remover los componentes inorgánicos (Beach DA, 2014).

Se han sugerido distintos protocolos de irrigación durante el tratamiento de conductos para mejorar la desinfección, algunos de los cuales implican un uso secuencial de NaOCl y un agente descalcificador. En un estudio, concluyeron que la aplicación combinada de 17% de EDTA y 2.5% de NaOCl reduce significativamente la cantidad de biopelícula intraconducto (Ozdemir H et al., 2010)

En otro estudio Yang y Bae en el 2002, encontraron que después de la irrigación con NaOCl 5% y EDTA, se redujo considerablemente la concentración de bacterias adheridas a las paredes del conducto radicular como *Prevotella nigrescens* (Yang S et al., 2002).

A pesar de la minuciosa preparación mecánica y química durante el tratamiento del conducto radicular, la infección puede persistir (Zhang et al., 2015). Es probable que haya un fracaso del tratamiento por la presencia de las distintas bacterias dentro de los conductos radiculares, provocando una posible formación de lesiones endodónticas persistentes (Rosen E et al., 2016). Por lo tanto, el examen bacteriano durante el tratamiento de los conductos infectados se ha realizado con el fin de evaluar los resultados del tratamiento; resultando en un buen pronóstico (Sato T et al., 2012).

4.6 Método de Identificación Microbiana

A través de los años los microorganismos que se encuentran en la microbiota endodóntica se han investigado tradicionalmente mediante los diferentes métodos de cultivos microbiológicos. Estos métodos se basan en otorgarle a los microorganismos las condiciones necesarias, como temperatura, humedad, pH, y nutrientes para que tenga un crecimiento y sobrevivan, dándoles los nutrientes necesarios (Casaso M et al., 2012).

Los análisis de cultivo consisten en la obtención de los siguientes pasos: recolectar y transportar la muestra, dispersión, dilución, cultivo, aislamiento e identificación (Casaso M et al., 2012).

Las ventajas de los métodos de cultivo son; la identificación de especies inesperadas, permite cuantificar todos los microorganismos principales cultivables viables de la muestra, permite determinar la sensibilidad antimicrobiana y fácil de conseguir (Siqueira J et al., 2011).

Entre las desventajas que se describen son la dificultad de cultivar un gran número de especies bacterianas, baja sensibilidad, dependencia estricta del modo de transporte de la muestra, la muestra requiere su procesamiento inmediato, sus métodos son laboriosos, costosos y tardan tiempo y tardan varios días o semanas en identificar la mayoría de los microorganismos anaerobios (Siqueira J et al., 2011).

Dependiendo al cultivo a utilizar los medios de cultivo se clasifican de la siguiente manera (López, L 2006; Casaso M et al., 2012):

Según su origen:

1. Naturales: son los preparados a partir de sustancias de origen animal o vegetal como extractos de tejidos o infusiones, cuya composición química no se conoce exactamente.
2. Sintéticos: son los medios que contienen una composición química definida cuali y cuantitativamente. Utilizados para obtener resultados reproducibles.
3. Semi-sintéticos: son los sintéticos a los que se les agregan factores de crecimiento bajo una un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura.

Según su consistencia:

1. Líquidos: se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa.
2. Sólidos: se preparan añadiendo un agar a un medio líquido (caldo) de 15g/litro. El agar es una sustancia inerte polisacárida (hidrato de carbono) que se extrae de las algas. Como esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye ningún elemento nutritivo; puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo y presentan la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias.
3. Semisólidos: contienen 7.5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio.

Entre los medios líquidos, se destacan el Caldo Trypticase Soya-TSB y Caldo Infusión Cerebro Corazón-BHI (Casaso M et al., 2012).

En 1919, Rosenow creó un medio óptimo para cultivar estreptococos mediante el uso de un caldo de dextrosa suplementado con tejido cerebral. La formulación de Rosenow fue luego modificada por Hayden, quien descubrió que la adición de mármol triturado resultó en un crecimiento favorable de patógenos dentales (Rosenow E, 1999). Sin embargo, años después la fórmula utilizada contenía infusión de cerebro y corazón en lugar de tejido cerebral, mientras que el fosfato disódico reemplazó al carbonato de calcio (Murray P, 1999).

La incubación del material debe priorizar los microorganismos anaerobios, considerando que la presencia de microorganismos aerobios estrictos es fugaz o inexistente. La incubación debe ser realizada en anaerobiosis, alcanzada por medio físico (vacuo e insuflación con una mezcla con el 80% de N₂ el 10% H₂ y el 10% de CO₂) o medio químico (sistema Gazpak o Anaerobac). El tiempo de incubación varía entre 3, 6 y 14 días. (Molander et al, 1998).

En el medio líquido o semisólido, la lectura tiene como referencia la presencia o ausencia de turbidez del mismo, indicativa, o no, del crecimiento y multiplicación de microorganismos. El medio sólido va a permitir el aislamiento de microorganismos, la determinación de su capacidad hemolítica, la obtención de cultivo puro y subsecuentemente, su caracterización morfológica, fisiológica y/o genética y, cuando es necesario, el análisis de sensibilidad a antimicrobianos. (Siqueira, 1997).

El BHI es un medio de uso general utilizado para el aislamiento, el cultivo y el mantenimiento de una variedad de microorganismos exigentes. Es una base altamente nutritiva que cumple con los requisitos de crecimiento de muchos tipos de microorganismos, incluidas bacterias, levaduras y mohos.

4.7 Método de Bioluminiscencia

La Bioluminiscencia es una tecnología basada en la detección del ATP (Trisfosfato de adenosina), la cual es una molécula energética de todos los organismos vivos (Chollet R y Ribault S, 2012). Fue primeramente introducida por la NASA en 1960 como una posible medida para detectar vida en otros planetas y como medida preventiva de contaminación en el agua reciclada durante los viajes al espacio. Sin embargo en 1753, Benjamin Franklin ya había observado “pequeños animáculos” generando en el agua una luz visible. Por la misma época, el naturalista Godehe de Rivilie, con un microscopio confirmó lo de Franklin, a esos animáculos ahora se les conoce como placton. (Jabr F, 2016). A finales de la década de los noventa, el biólogo marino Steven Haddock y el científico Osamu Shimomura compartían una obsesión con la bioluminiscencia: luz producida por reacciones químicas en los cuerpos de los seres vivos, la más famosa es conocida como luz de la luciérnaga, estas poseen una enzima llamada Luciferina-Luciferasa que al combinarse con el ATP producen luz; pero también están presentes en hongos y una multitud de criaturas marinas (Giana H et al., 2003; Roda A, 2004; Jabr F, 2016).

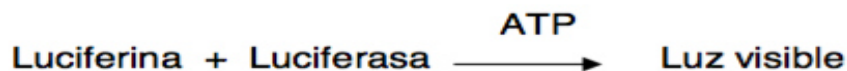
4.7.1 ATP

El trifosfato de adenosina es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular, fue descubierto por primera vez en el músculo humano en 1929 en los Estados Unidos por Cyrus H. Fiske y Yellapragada Subbarao, e independientemente, en Alemania por Karl Lohman (Venkateswaran K et al., 2003). Sin embargo, hasta diez años más tarde no empezó a reconocerse el papel central del ATP en la transferencia de energía (Roda A, 2004).

Este nucleótido está formado por una base nitrogenada (adenina) unida al carbono 1 de un azúcar de tipo pentosa, la ribosa, que en su carbono 5 tiene enlazados tres grupos fosfatos (Venkateswaran K et al., 2003). Es la principal fuente de energía para la mayoría de las funciones celulares. Se produce durante la foto-respiración y la respiración celular, y es consumido por muchas enzimas en la catálisis de numerosos procesos químicos. Su fórmula molecular es $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ (Magic-Knezev A, van der Kooij D, 2004).

El proceso de emisión de luz de los organismos se denomina bioluminiscencia y representa una conversión química de energía en luz (Gray J, Sterak A et al., 2010). El término de bioluminiscencia es una alternativa a los procedimientos de control de calidad microbiológicos en las industrias alimentaria y hospitalaria proporcionando resultados rápidos, exactos y sensibles a través de un procedimiento sencillo por medio del ATP (Chollet R y Ribault S, 2012).

Figura 1.



Reacción del ATP.

La bioluminiscencia de ATP con luciferina / luciferasa se basa en la oxidación de luciferina por la luciferasa y la intensidad de luz integrada es directamente proporcional al contenido de ATP (Venkateswaran K et al., 2003).

Cuando se requiere comprobar la ausencia de microorganismos, restos de tejido o de células humanas o material de origen biológico en general, puede utilizarse el ATP, la luminosidad resultante se transforma en impulso eléctrico que amplificado puede convertirse en una señal analógica (Roda A, 2004). Esta señal corresponde con la cantidad de moléculas de ATP detectadas y resulta en un valor de “unidades relativas de luz” que indica la pantalla del equipo (Gray J, Sterak A et al., 2010).

El instrumento utilizado se denomina Luminómetro, aunque sería más preciso el término ATP-metro (Di Lalla N, 2014).

4.7.2 Luminómetro MVP ICON

A través del método de bioluminiscencia se permite verificar la efectividad del proceso de sanitización llevado a cabo en los puntos críticos seleccionados en áreas y equipos de la industria alimentaria y hospitalaria, favoreciendo la calidad del proceso de producción y evitando la contaminación de productos ya terminados. Con este sistema se detecta la posible contaminación que queda bajo el principio de bioluminiscencia (Chollet R y Ribault S, 2012).

Ofrece una forma de detectar y cuantificar microorganismos vivos cultivados en una membrana. Al combinar ATP-bioluminiscencia y un sistema de detección sensible, la detección microbiana se obtiene más rápido que el método tradicional (Barreto A, 2003). Con el fin de detectar una colonia o una micro-colonia en una membrana por ATP-bioluminiscencia.

Hay distintas marcas de equipos que utilizan el método de luminiscencia, uno de ellos es el MVP ICON, el cual analiza diversas superficies cuantificando el ATP residual determinando el grado de higiene de una superficie presente midiéndolo en Unidades Relativas de Luz (URL) (Chollet R y Ribault S, 2012). Con este se generan valores que permiten hacer el cálculo estadístico para establecer los límites de aceptación, alarma o de rechazo. Para esto el sistema usa el principio de bioluminiscencia cuantificando el ATP (Barreto A, 2003).

El MVP ICON es un instrumento ligero de pantalla táctil que está diseñado para apoyar en los planes de limpieza de las plantas productoras de alimentos y en la limpieza y verificación de sanitización de equipo hospitalario; está diseñado para medir los niveles de ATP permitiendo auditar en cuestión de segundos el nivel de limpieza de diferentes áreas.

Este equipo se compone de hisopos para la toma de muestras, reactivos con la enzima luciferina-luciferasa, una solución de enjuague el cual se obtiene al activar el hisopo y el luminómetro para cuantificar el ATP (Barreto A, 2003; Fotti L, 1999).

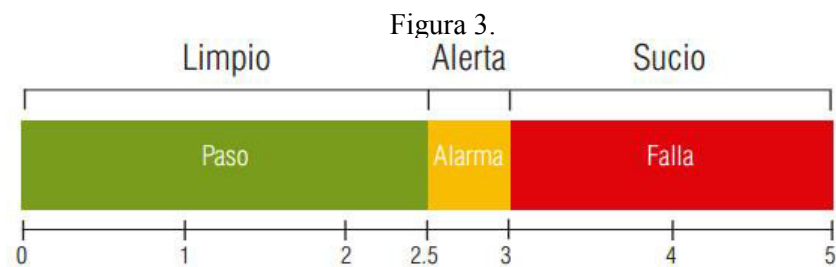


Dispositivo Luminómetro MVP ICON

El principio en el que se basa el método para la toma de la muestra de un área es mediante un hisopo extrayendo el ATP tanto a las bacterias como a los residuos de alimentos que hayan quedado después de la limpieza. Una vez extraído el ATP, éste se activa y se libera una solución-buffer que se encuentra en el bulbo superior con reactivos con la enzima luciferina-luciferasa y que arrastrará el ATP extraído quedando al final la mezcla (ATP-Solución), el cual al entrar en contacto, producen una reacción luminosa de bioluminiscencia depositada en la parte inferior del hisopo (Griffith C, 2007; ICON Brochure 2013). Una vez activada la solución, éste se inserta en el luminómetro MVP ICON, llevando a cabo la lectura que medirá el nivel de luz emitido por la reacción (ICON Brochure 2013).

El equipo realiza una serie de cálculos logarítmicos internos y presenta los resultados. En tanto mayor ATP esté presente en la muestra mayor será la luz emitida y por ende mayor será la concentración de bacterias y/o residuos orgánicos en el área muestreada (Lightning MVP ICON 2015). Igualmente a menor emisión de luz detectada por el luminómetro menor será la concentración de bacterias y/o residuos presentes en el área muestreada. Esto indicará el nivel de limpieza en el que se encuentra la línea de producción (Lewis T, 2008).

A bajas concentraciones, existe una correlación lineal entre concentración de ATP y URL, por lo tanto se puede establecer un rango de contaminación (o de limpieza) de la superficie a realizar la muestra, por ejemplo de la siguiente manera (MVPICON User Guide 2012):



Escala de Limpieza MVP Icon

En esta escala, las lecturas de “ Paso” ó aprobación son por debajo de 2.5, el nivel de “fallo” es de 3.0 a 5.0, indicando que la superficie está muy sucia, y las lecturas que estén en el rango de 2.5 a 3.0 indica se está en el nivel de “advertencia” (Lightning MVP ICON 2015).

Algunas de las ventajas en utilizar el método de bioluminiscencia es que ofrece resultados en un rango de 10 a 15 segundos, dependiendo del equipo que se esta usando, y esto permite decidir casi inmediatamente si se deberá limpiar y sanitizar de nuevo en área de muestreo. Entre otras ventajas: facilidad en su uso, detección de menor cantidad de microorganismos, mayor exactitud (Lightning MVP ICON 2015).

No obstante también cuenta con ciertas desventajas como lo son: un costo elevado, no hay diferencia entre el ATP de microorganismos vivos y muertos, no hay diferencia entre el ATP bacteriana y el ATP eucariótico (MVPICON User Guide 2012). La cantidad de ATP intracelular varía entre diferentes especies de microorganismos y los cambios dependen de la actividad metabólica, es decir, puede haber hasta un 70-90% de reducción en ATP intracelular entre la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria de crecimiento (Guía de Monitoreo de Higiene por Bioluminiscencia 2010).

Utilizar de forma correcta esta técnica es la base del monitoreo de condiciones higiénicas, en un ámbito de elaboración y/o manipulación de alimentos, de producción de medicamentos o de una institución hospitalaria (Lewis T, 2008). Sin embargo esta técnica se puede implementar en otras áreas de la salud, siendo la odontología una rama amplia en donde en ciertas especialidades como la endodoncia pueden ser la base del monitoreo de la asepsia del tratamiento.

5. MÉTODOS

Se realizó un estudio comparativo, abierto, experimental, prospectivo en el cual se evaluó la correlación en cuanto a la lectura del ATP de las células bacetrianas utilizando el dispositivo MVP Icon (Biocontrol System, Biomonitoring Business) y la medición de densidades ópticas en un lector de microplacas (Microplate autoreader, Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA).



Fig 4. Dispositivo MVP Icon



Fig 5. Lector de Microplacas

5.1 Descripción estudio *in vitro*.

Los especímenes incluidos en el estudio fueron piezas unirradiculares extraídas del humano, debidamente conservadas, raíces intactas al examen clínico, ápices completamente formados y conductos viables con una lima K no. 10; se excluyeron del estudio los órganos dentarios con tratamiento de endodoncia previo o que presentaran conductos calcificados y finalmente se eliminaron aquellos especímenes en los cuales se fracturó algún instrumento endodóntico durante el experimento.

Se recolectaron 24 órganos dentarios unirradicales los cuales fueron almacenados en solución fisiológica con 5 gotas de hipoclorito de sodio, se limpió la superficie externa de la raíz utilizando curetas periodontales Gracery no.13 y no.14 (Hu-Freedy, Chicago, IL, USA) Se realizó el acceso utilizando fresas de carburo de bola no. 4 con un piezo de alta velocidad, se exploró el conducto con una lima K no. 10 para verificar la viabilidad de los conductos; posteriormente se determinó la longitud de trabajo observando la punta de la lima en el límite del foramen apical y a dicha medida se le restó 1mm; posteriormente las superficies oclusales o incisales de los órganos dentarios fueron desgastadas con el fin de crear un punto de referencia uniforme y estandarizar la longitud de trabajo a 16mm. Se instrumentaron los conductos con la técnica Wave One Gold hasta la lima Large 045/.05 (Dentsply, Syrona) y la irrigación durante la instrumentación fue con hipoclorito de sodio al 5.25% para mantener la permeabilidad del conducto, se utilizaron puntas de papeal Hygenic para secar el conducto; finalmente los órganos dentarios fueron colocados en una gradilla hecha a base de silicona Speedex Trial (Coltene Whaledente) se esterilizaron en un autoclave durante 30 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

Dentro de la campana de flujo laminar, se realizó la activación de la cepa bacteriana de *Enterococcus faecalis* (ATTCC47077L), se tomaron 100 µl con una micropipeta Eppendorf y se inocularon en 10ml caldo de tripticaseína de soya, posteriormente se colocó la cepa bacteriana en la incubadora Shel Lab a 37°C durante 24 horas.

Una vez activada la bacteria se colocaron 10 µl a una concentración bacteriana de 1×10^3 de ésta mezcla para llenar el conducto radicular, mediante el uso de la Micropipeta Eppendorf retirándola lentamente del conducto y sellando la entrada del conducto con cinta testigo estéril, se colocó en bolsas herméticas y se incubaron durante 7 días a 37 °C y posteriormente se volvió a rellenar el conducto con cepa bacteriana durante 2 semanas posteriores.



Fig 6. Inoculación Bacteriana

Para hacer la correlación del crecimiento bacteriano entre MVP Icon (Detección del ATP de las bacterias) y la medición densidades ópticas en un lector de microplacas (Microplate autoreader, Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA) los órganos dentinarios se dividieron en 2 grupos, de cada grupo se tomó dos muestras A y B, de igual manera se obtuvo un grupo de control positivo y otro control negativo.

En el grupo 1 se tomaron las dos muestras del conducto totalmente contaminado con la cepa *Enterococcus faecalis* en condiciones asépticas bajo la campana de flujo laminar; en la muestra A se utilizó una punta de papel no. 40 Hygienic previamente esterilizada y se efectuó la lectura con el MVP Icon (Detección del ATP de las bacterias), para la muestra B se tomó con una punta de papel no.40 Hygienic del conducto y se colocó en un tubo Eppendorf que contenía caldo de tripticaseína de soya, todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas, posteriormente se tomaron 200 µl y se colocaron en una microplaca de 96 pozos (formato de 12 x 8; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) y se efectuó la medición de densidades ópticas en un lector de microplacas (Microplate autoreader, Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA) a 570nm. En ambas muestras se utilizó como control positivo medio de cultivo y la cepa bacteriana y para el control negativo medio de cultivo sólido.



Fig 7. Materiales para toma de muestra



Fig 8. Toma de muestras

En el grupo 2 se tomaron las muestras del conducto después de la implementación de protocolo de irrigación, se utilizó ultrasonido NSK para activar la irrigación con limas U de punta no cortante de acero inoxidable #25, se irrigó con un 1 ml 5.25% NaOCl por 30 segundos, 1 ml de 17% EDTA (Uldradent) por 30 segundos y un 1 ml de 5.25% NaOCl por otros 30 segundos.



Fig 9. Protocolo de Irrigación

Para el grupo 2 se tomaron dos muestras del conducto después del protocolo de irrigación en condiciones asépticas bajo la campana de flujo laminar; en la muestra A se utilizó una punta de papel no. 40 Hygienic previamente esterilizada y se efectuó la lectura con el MVP Icon (Detección del ATP de las bacterias), para la muestra B se tomó con una punta de papel no.40 Hygienic del conducto y se colocó en un tubo Eppendorf que contenía caldo de tripticaseína de soya, todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas, posteriormente se tomaron 200 µl y se colocaron en una microplaca de 96 pozos (formato de 12 x 8; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) y se efectuó la medición densidades ópticas en un lector de microplacas (Microplate autoreader, Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA) a 570nm. En ambas muestras se utilizó como control positivo medio de cultivo y la cepa bacteriana y para el control negativo medio de cultivo.

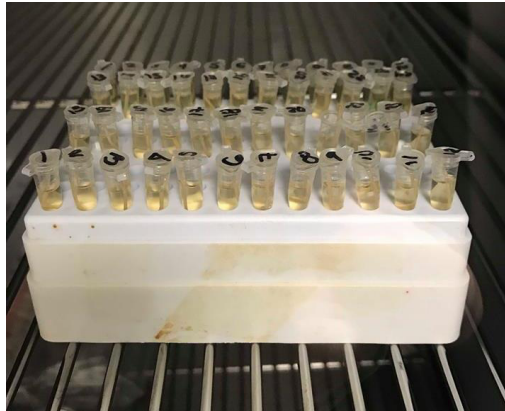


Fig 10. Incubación de la muestra método tradicional

5.2 Descripción del estudio *in vivo*

Para el estudio *in vivo* se estudiaron diez piezas unirradiculares o raíces palatinas y distales de molares de pacientes que acudieron a realizarse tratamiento endodóntico en el Posgrado de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, presentando necrosis pulpar con o sin lesión perirradicular basado en síntomas clínicos y hallazgos radiográficos. Así mismo debían tener buena integridad coronaria, no tener un tratamiento de conductos previo y no tener antecedente previo de tracto sinuoso. Se utilizó la misma metodología del estudio previo *in vitro*.

Fase 1: Tratamiento Endodóntico

Se inició el tratamiento de conductos radiculares, anestesiando la zona a tratar y se aisló la pieza utilizando un dique de goma de hule y un clamp adecuado, después se desinfectó el dique de goma con peróxido de hidrógeno al 30% seguido de tintura de yodo al 5% de acuerdo con el método descrito por Möller. Los desinfectantes se desactivaron con 5% de tiosulfato de sodio, y se obtuvo una muestra de control de esterilidad frotando un algodón estéril sobre la superficie oclusal del diente, transfiriéndolo a un tubo Eppendorf, se utilizó el caldo de tripticaseína de soya como medio de cultivo. Se procedió a realizar el acceso con una fresa de bola no. 4, y para el acceso en línea recta se utilizó la fresa EndoZeta (Denstply). El mismo protocolo de desinfección del dique de goma se repitió. Se procedió a tomar las dos primeras muestras con puntas de papel estériles; la primera muestra fue colocada en el dispensador del MVP Icon y la segunda muestra en el tubo Eppendorf con medio de cultivo caldo de tripticaseína de soya. Se continuó con el tratamiento, se tomó la longitud de trabajo utilizando el localizador apical Root ZX Mini (Morita) y se verificó por medio de una radiografía digital. Se instrumentó con el sistema de Wave One Gold hasta la lima Large 045/.05 (Dentspy, Syrona), durante la instrumentación se irrigó con hipoclorito de sodio al 5.25% de forma pasiva utilizando una jeringa y una aguja Endo-Eze de calibre 27 (Ultradent) con salida lateral en la punta llevándola a su máxima penetración.

Fase 2: Protocolo de Irrigación

Después de la instrumentación se procedió a realizar el protocolo de irrigación, se utilizó ultrasonido NSK para activar la irrigación con limas U de punta no cortante de acero inoxidable #25, se irrigó un 1 ml 5.25% NaOCl por 30 segundos, 1 ml de 17% EDTA (Ultracent) por 30 segundos y un 1 ml de 5.25% NaOCl por otros 30 segundos. Se procedió a tomar las dos muestra con puntas de papel estériles.

Se secó el conducto con puntas de papel no. 40 Hygienic previamente esterilizadas y se colocó hidroxido de calcio (UltraCal de Ultracent) para su posterior obturación.

Fase III: Lecturas de las muestras

La primera muestra fue colocada en la cámara de bioluminisencia MVP Icon y se procedió a la lectura registrando el resultado en la base de datos.

En la segunda muestra, la punta de papel no. 40 Hygienic fue colocada en un tubo Eppendorf con caldo de tripticaseina de soya y se incubó durante 24 horas a 37°C; después 200 µl se colocaron en una microplaca de 96 pozos (formato de 12 x 8; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) y se efectuó la medición densidades ópticas en un lector de microplacas (Microplate autoreader, Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA) a 570nm.

Los resultados se analizaron de acuerdo a la técnica paramétrica de K2 de D'Agostino y se graficaron.

6. DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El modelo estadístico analítico del presente proyecto consistió en la aplicación de la técnica paramétrica de K2 de D'Agostino para evaluar y determinar la distribución de una muestra, posterior a esta técnica se procedió a utilizar el modelo de correlación de Pearson, modelo el cual puede utilizarse para medir el grado de asociación de dos variables siempre y cuando ambas sean cuantitativas y continuas.

De igual manera se utilizó el coeficiente de correlación de concordancia para evaluar si los métodos utilizados en el proyecto son acordes uno con otro; esta prueba se realiza cuando se desea conocer si un método o instrumento nuevo, diferente al habitual, obtienen resultados equivalentes de tal manera que eventualmente uno y otro puedan ser remplazados o intercambiados ya sea porque uno de ellos es más sencillo, menos costoso.

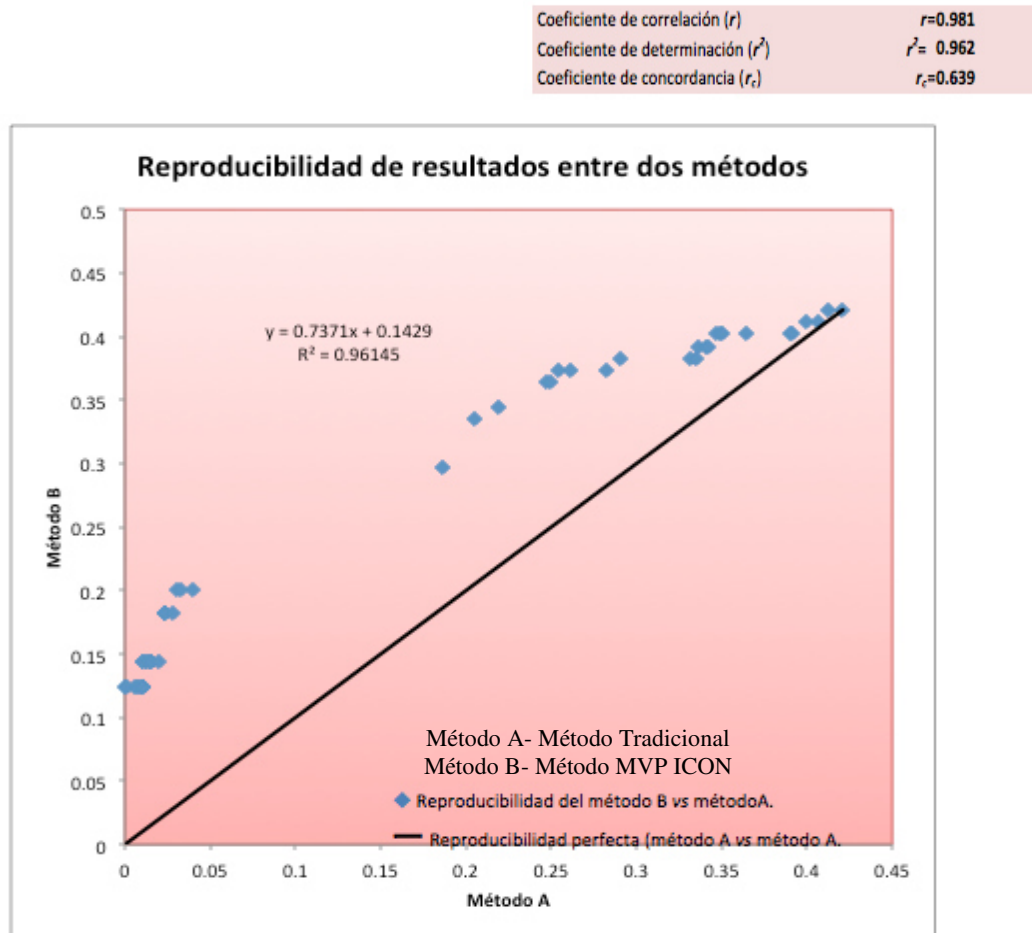
De acuerdo a las técnicas utilizadas, las cuales fueron evaluadas con un 95% de confiabilidad se determinó la relación entre el método de detección de bacterias con el MVP ICON y el método de cultivo tradicional Caldo Infusión Cerebro-Corazón en un modelo *in vitro* e *in vivo*; esto se realizó bajo las siguientes pruebas estadísticas:

$$K^2 = Z_{g1}^2 + Z_{g2}^2 \quad r_c = (2 (SC_{xy})) / (SC_x^2 + SC_y^2 + (n - 1) (\bar{x} - \bar{y})^2)$$

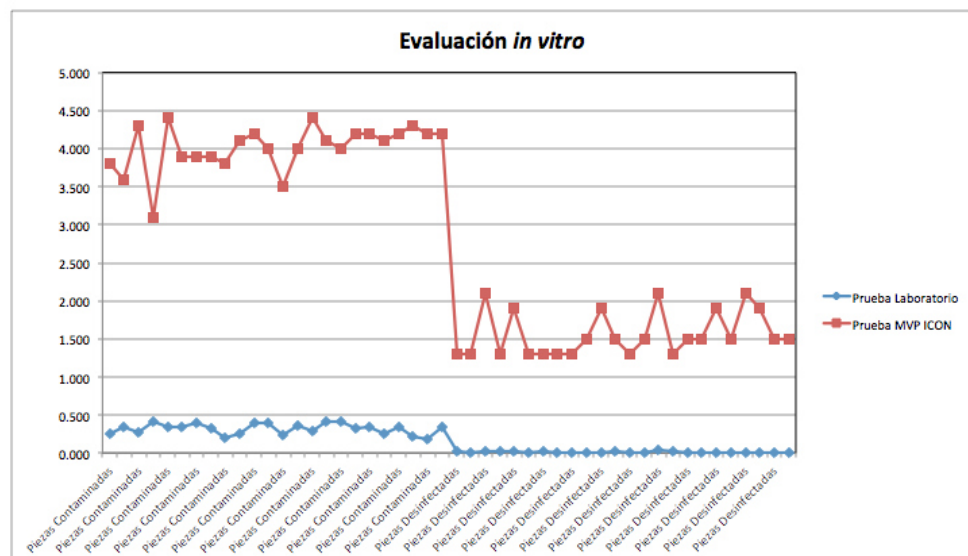
7. RESULTADOS

7.1 Resultados *In Vitro*

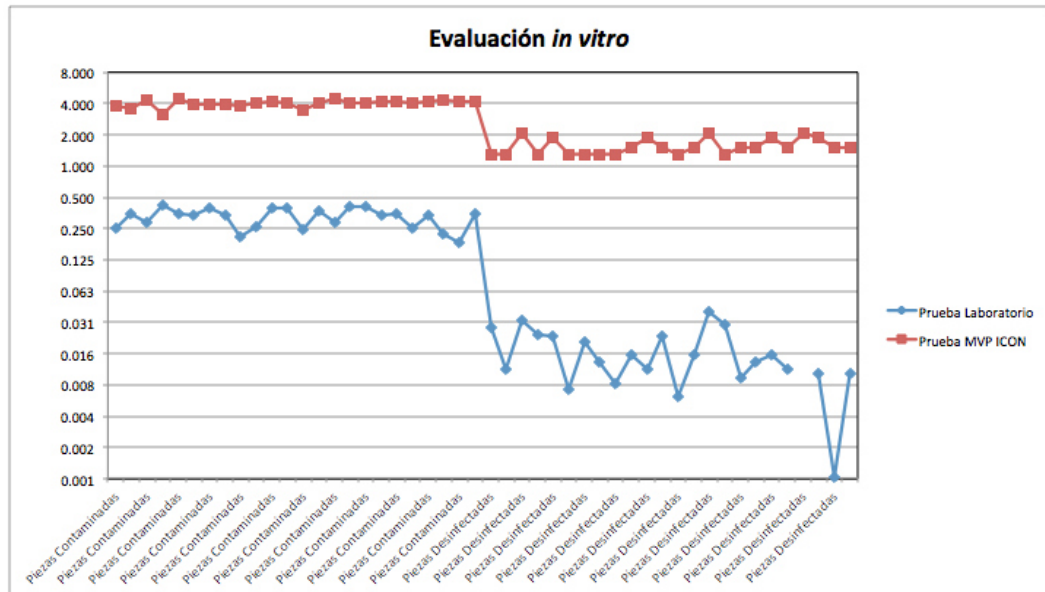
Gráfica de Resultados de Reproducibilidad *In Vitro* 1.



Gráfica Escala *In Vitro* 2.



Escala Logarítmica *In Vitro* Gráfica 2.

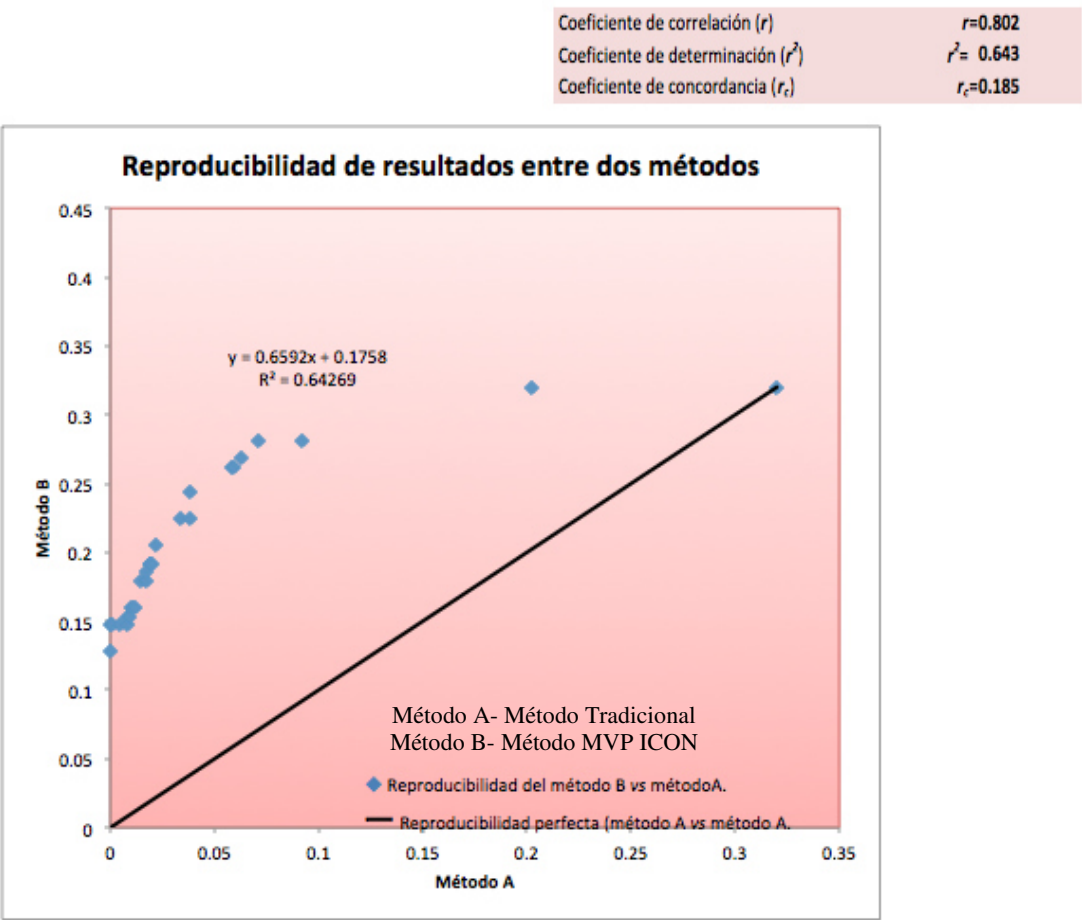


La concordancia (correspondencia) entre ambos métodos puede considerarse media, con un coeficiente del 63.9% en el experimento *in vitro*. Por tanto, y con base en los datos obtenidos, a pesar de que con ambos métodos se obtiene el mismo patrón de resultados, ambos métodos son poco concordantes entre sí.

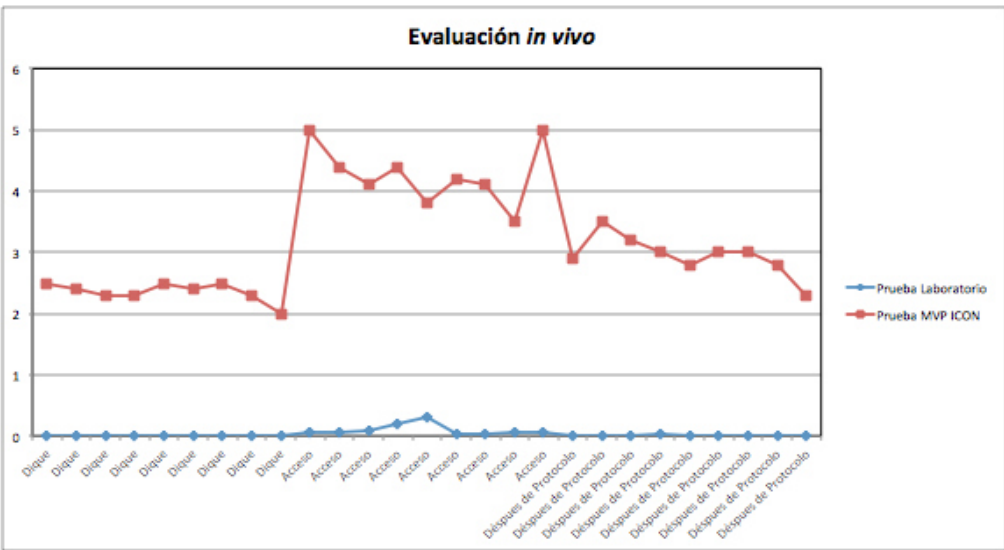
En cambio, ambos métodos presentan una asociación fuerte y positiva del 98.1%, con base en los resultados obtenidos. Lo que indica, que a pesar de no manejar las mismas unidades, cuando se obtengan valores altos con un método, se obtendrán valores altos con el segundo método (en sus respectivas escalas), y viceversa. Entre ambos métodos se mantiene el promedio de las piezas contaminadas y como es deseado la disminución del nivel de contaminación en las piezas desinfectadas

7.2 Resultados *In Vivo*

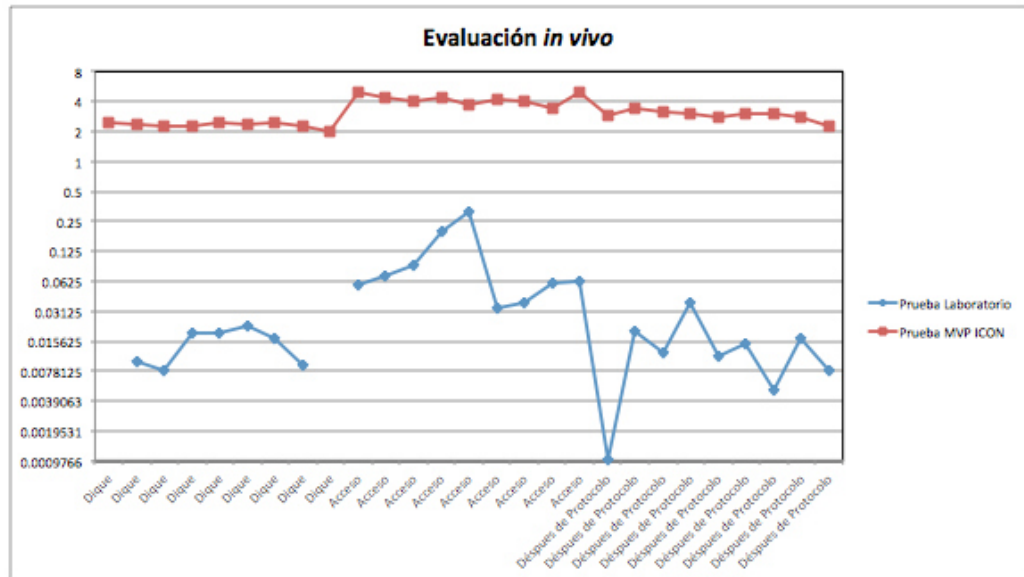
Gráfica de Resultados de Reproducibilidad *In Vivo* 1.



Gráfica Escala *In Vivo* 2.



Escala Logarítmica *In Vivo* Gráfica 2.



En este estudio *In Vivo* la concordancia entre ambos métodos puede considerarse baja o inexistente, con un coeficiente del 18.5% en el experimento *in vivo*. Por tanto, y con base en los datos obtenidos, se puede afirmar que ambos métodos en tales condiciones experimentales son completamente distintos. Y que en condiciones *in vivo* existen más variables no controladas.

En cambio, ambos métodos presentan una asociación fuerte y positiva del 80.2%, con base en los resultados obtenidos. Lo que indica, que a pesar de no manejar las mismas unidades, cuando se obtengan valores altos con un método, se obtendrán valores altos con el segundo método, en sus respectivas escalas, y viceversa.

8. DISCUSIÓN

Aunque el objetivo del tratamiento de endodoncia es eliminar las bacterias que se encuentran dentro del sistema de conductos de las piezas con necrosis pulpar y/o con periodontitis apical; la evaluación del grado de desinfección actualmente no se realiza de forma rutinaria, en parte debido a la falta de un método rápido y eficaz durante la cita del tratamiento (Tan K et al., 2015, Herzog, D et al., 2017). Actualmente se ha introducido el método de bioluminiscencia a nivel laboratorio, el cual tiene un alto potencial en la lectura del ATP para comprobar los microorganismos bacterianos persistentes en los tratamientos de endodoncia (Tan K., 2015). Sin embargo, los procedimientos empleados siguen incrementando el tiempo de obtención de resultados en cuanto a la presencia de bacterias.

El ATP es la principal fuente de energía de organismos vivos y sirve como un indicador de actividad metabólica en células viables. Se ha reportado en la literatura el uso del ATP con el método de bioluminiscencia en detectar la contaminación de bacterias en muestras de alimentos, agua potable y dispositivos médicos (Venkateswaran K et al., 2003; Roda A, 2004; Delahaye E et al., 2003; Magic-Knezev A., 2004). En el ámbito odontológico este método se ha utilizado para cuantificar bacterias orales en muestras de placa dentobacteriana (Sánchez M et al., 2013).

Los métodos tradicionales diseñados para recolectar e incubar microorganismos anaerobios son poco prácticos y tardan alrededor de 24 a 72 hrs para obtener resultados sobre el nivel bacteriano, siendo una desventaja al no tener la posibilidad de garantizar la calidad y seguridad del procedimiento efectuado. (Herzog, D., 2017). La lectura del ATP no sólo permite identificar rápidamente un problema si no, tomar acciones correctivas inmediatas para asegurar que un área crítica se encuentra bajo los requerimientos de higiene adecuados. (Modragon G., 2010)

A diferencia de otros estudios (Sato et al., 2012; Herzog, D et al., 2017), se utilizaron tinciones de fluorescencia los cuales se identifican con un microscopio fluorescente y un espectrómetro a nivel laboratorio, en otro estudio realizado por Tan K et al., utilizaron el luminómetro GloMax Microplate el cual es un dispositivo utilizado de igual manera a nivel laboratorio; en nuestro estudio se utilizó el luminómetro MVP ICON que toma la lectura en un rango de tiempo de 10 a 15 segundos durante la el procedimiento endodóntico, siendo el primer artículo en utilizar esta tecnología.

El método utilizado para tomar la muestra pudiera ser criticado, en el presente estudio se empleó la técnica escrita por Möller para la desinfección antes de la toma de cada muestra así como fue utilizado en otros estudios (Möller AJ, 1996; Tan et al., 2015). La contaminación durante el proceso de muestreo se controló mediante controles de esterilidad.

Se tomó una muestra al realizar el acceso y después del desbridamiento químico-mecánico; para garantizar la reducción de la carga bacteriana comparando las muestras en estas dos etapas del tratamiento, demostrando la detección de bacterias residuales directamente en puntas de papel, empleando sólo el tiempo necesario para el tratamiento

de conductos, apegándose a los tiempos y procedimientos que nosotros realizamos en nuestra práctica endodóntica diaria, haciendo del método clínicamente más relevante que otros (Sato et al., 2012; Sánchez M et al., 2013).

Cada muestra fue validada por el standard de oro el actualmente aceptado el cultivo bacteriano anaerobio (Estrela, 2005; Gray J et al., 2010).

El tomar la muestra con punta de papel está restringido, sin embargo estas puntas de papel tienen como ventaja que son altamente absorbentes y flexibles, mejorando la detección de las células vivas en el ápice radicular, así como poder tocar las paredes laterales del conducto, que pudieran permanecer intactas por la instrumentación mecánica (Peters et al., 2003).

El objetivo del estudio es desarrollar un método que permita a los endodoncistas detectar de manera objetiva y rápida la contaminación bacteriana residual durante el tratamiento de conductos evitando causar alguna interrupción en el trabajo clínico.

El potencial para minimizar las infecciones endodónticas reduciría los costos de tratamiento y evitaría una visita secundaria innecesaria cuando no se detectan bacterias. Esta tecnología también tiene el potencial de ser aplicada en otras áreas, clínicamente y en investigación. Las aplicaciones de investigación podrían incluir la evaluación de métodos de desinfección de biofilm en áreas de periimplantitis e infección ósea, así como investigación general de antibióticos y antimicrobianos.

Con las limitaciones de este estudio en el tiempo que se tuvo el aparato MVP ICON y por las distintas variables presenten en cada estudio se puede determinar que no existe proporcionalidad entre la Unidades Formadoras de Colonia (UFC) obtenidas por método tradicional y las Unidades Relativas de Luz (URL) obtenidas por método de bioluminiscencia, ya que son dos métodos distintos con diferentes unidades de medición y hay diversas variables que se pueden presentar al tomar una muestra como el tiempo de exposición, tiempo de traslado, manipulación, pH, flora bacteriana nativa, biopelículas, entre otras.

Así como se ha reportado en otros estudios, el método de detección de ATP puede usarse como una herramienta rápida y eficaz para determinar la presencia de bacterias viables durante la terapia del conducto radicular determinando el grado de desinfección, debido a que los resultados se conocen en pocos segundos, logrando así la rapidez y optimización en los resultados generando la seguridad requerida para demostrar la calidad microbiológica de inmediato. Este método puede ser potencialmente útil como complemento del tratamiento de conducto (Tan K et al., 2015; Herzog D et al., 2017). Aunque el ATP no permite identificar la microbiota endodóntica presente dentro del sistema de conductos, dicha información tiene un valor limitado ya que las infecciones endodónticas son polimicrobianas, pueden haber diversas etiologías y variar entre cada individuo (Siqueira J et al., 2004, 2009).

Aún no hay informes en donde se afirme que las pruebas de bioluminiscencia reemplacen las pruebas de microbiología tradicional, esta nueva técnica es una herramienta complementaria que permite hacer eficientes los procesos de limpieza y

sanitización (Mongragón G, 2010). Aún con estas limitaciones, sigue siendo el análisis microbiológico con base en el cultivo líquido o sólido más valioso para conocer si sigue existiendo la presencia de microorganismos. (Estrela, 2005).

En este estudio el método de bioluminiscencia permitió cuantificar los niveles de ATP de los microorganismos intraconducto midiéndolo en URL, de igual manera en el método tradicional analizando las muestras en UFC, por tanto su comparación en el estudio *in vitro* e *in vivo* son muy bajas ya que el fundamento de cada técnica es distinto, además las unidades de medida utilizadas en el estudio por ambos métodos son diferentes por ende solo pueden ser descriptivas.

9. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y bajo las condiciones experimentales del presente estudio. Se llegaron a las siguientes conclusiones:

Con respecto al nivel de correlación entre los dos métodos se puede definir que se obtuvieron un índice de correlación alto mostrando que existe una relación de estos dos métodos en cuanto a sus resultados cuantitativos, obteniendo en este caso rangos similares de contaminación y desinfección.

Por lo anterior, fue posible apreciar que existe una relación significativa entre los grupos evaluados, lo anterior se concluyó mediante un nivel de confiabilidad del 95%.

Como recomendaciones:

- El método de bioluminiscencia puede ser un adicional al método tradicional, de forma continua para el control microbiológico de superficies radiculares y/o de control de sepsis durante el tratamiento y de esta forma tener como verificar el nivel de contaminación de los tratamientos, optimizando los resultados.
- Realizar más investigaciones *in vivo* con un número de muestra mayor al actual.
- Desarrollar un dispositivo más específico para el nivel odontológico ya que el MVP I con es un dispositivo utilizado a nivel industrial.

10. LITERATURA CITADA

1. AAE. Endodontics: Colleagues for Excellence: Endodontic Diagnosis. 2013. 2-4
2. Bammann LL, Estrela C. Microbiological aspects in endodontics: Endodontic Science. 2009(1):258–81.
3. Barreto, A. 2003. Certificación de los procesos de Limpieza y Desinfección en una planta cosmética implementando el sistema HY-LITE 2. Tesis de pregrado para optar al título de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. Pág. 1-2.
4. Beach DA. Solutions to debridement dilemmas. *Dent Today*. 2014; 33(5): 136-9
5. Becking AG Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Report of three cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Mar; 71(3):346-8.
6. Bender IB; Pulpal diagnosis: a review, *J Endod* 2000; 26:175
7. Boutsoukis C., Kishen A. Fluid dynamics of syringe based irrigation to optimise anti-biofilm efficacy in root canal disinfection, *Roots: Int Mag Endod*. 2012;4:22-31
8. Buehler WJ, Gilfrich JV, Wiley RC. Effect of low-temperature phase changes on the mechanical properties of alloys near composition TiNi. *J Appl Phys*. 1993;34(5):1475-77.
9. Carolina EC, Laura BL, Viviana GR, Valencia ME. Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC. *J Food Compost Anal*. 2007;20:248–52.
10. Casado M, Torrico G, Medina M. Manual de Medios de cultivo en el laboratorio de microbiología. 2012, 1-36.
11. Chaugule, V. B., Panse, A. M., & Gawali, P. N. Adverse Reaction of Sodium Hypochlorite during Endodontic Treatment of Primary Teeth. *Int J Clin Pediatr Dent*, 2015; 8(2), 153–156.
12. Chollet, R y Ribault, S. Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System, Bioluminescence - Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications, 2012(5):100-117
13. Dahlen G, Moller A., Jr . Microbiology of endodontic infection. In: Slots J, Taubman MA, editors. Contemporary Oral Microbiology and immunology. St. Louis: Mosby year Book Inc; 1991. pp. 444– 55.
14. Delahaye E, Welte B, Levi Y, et al. An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network. *Water Res* 2003; 37:3689–3696.
15. Du, T., Shi, Q., Shen, Y., Cao, Y., Ma, J., Lu, X. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms in vitro. *J. Endod*. 2013; 39, 1438–1443.
16. Elnaghy AM, Elsaka SE. Effect of sodium hypochlorite and saline on cyclic fatigue resistance of WaveOne Gold and Reciproc reciprocating instruments *Inter Endod J*. 2016; 50(10):991-998
17. Estrela, Carlos. 2005. Ciencia Endodóntica. Ed. Artes Médicas. Primera Edición. Pgs: 161-164.
18. Ferris Jabr The Secret History of Bioluminescence Hakai magazine May 2016
19. Flemming H, Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S.

- Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14:563–575.
20. Fotti, L. 1999. Light the way to better plant Hygiene. Microbiology Corporate Technology Centre. Publication 95.1.
 21. Giana HE, Silveira L Jr, Zângaro RA, Pacheco MT. Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis. *J Fluoresc.* 2003; 13(6):489–493.
 22. Goldberg M, Hirata A. The Dental Pulp: Composition, Properties and Functions. *JSM Dent* 2017;5(1): 1079.
 23. Gómez de Ferraris Campos Muñoz Histología y Embriología bucodental, 3a. Edición Editorial Médica Panamericana España 2002
 24. Gray, J. C.; Steark, A.; Berchtold, M.; Mercier, M.; Neuhaus, G. & Wirth A. Introduction of a Rapid Microbiological Method as an Alternative to the Pharmacopoeial Method for the Sterility test. *American Pharmaceutical Review.* 2010. 13(6), 88-94.
 25. Grifth, C.J. The effectiveness of existing and modified cleaning regimen in a Welsh hospital. *Journal of Hospital Infection.* 2007; 66:352–359.
 26. Grossman L. *Práctica endodóntica*. 11ed. Buenos Aires:Editorial Mundi; 2004.p.16–57.
 27. Guía de Monitoreo de Higiene por Bioluminiscencia. Professional Services 3M. Chile. 2010; 1-9.
 28. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 2005; 10: 77–102.
 29. Haapasalo M, Udnæs T, Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Topics* 2003; 6: 29–56.
 30. Haapasalo M., Shen Y., Wang Z., Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* 2014; 216:299–303.
 31. Harris DC. New York: W.H. Freeman Company; 2007. Quantitative Chemical Analysis.
 32. Herzog D, Hosny N, Niazi S, Koller G, Cook R, Foschi F, Watson T, Mannocci F, Festy F. Rapid Bacterial Detection during Endodontic Treatment. *J Dent Res.* 2017;96(6):626-632.
 33. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use a review. *Int Endod J*, 2003; 36:810-830
 34. ICON Brochure. Lightning MVP ICON. Biocontrol system. 2013; 1-3.
 35. Khalifa L, Brosh Y, Gelman D, Copenhagen-Glazer S, Beyth S, Poradosu-Cohen, R. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2015; 2696–2705
 36. Kiryu T, Ando N, Hinata T, “Evaluation of various tubed media for efficient bacterial examination in endodontics,” *Niigata Dental Journal*, 1992, 22:(1)15–20.
 37. Kishen, A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endod. Topics* 22, 2012; 99–123.
 38. Kishen, A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endod. Topics* 2012,22:99–123.
 39. Klein, A.H. (1965). Bioluminescence. Lippincot, Philadelphia.
 40. Leonardo, MR. 2002. Sistemas Rotatorios en Endodoncia: Instrumentos de Níquel-Titanio. Sao Paulo, Editorial: Artes Médicas.
 41. Lewis, T. A modified ATP benchmark for evaluation the cleaning of some hospital

- environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection*. 2008; 69:156–168.
42. Liébana, J. *Microbiología oral*, 2º Edición, McGraw-Hill-Interamericana, Madrid 2002
 43. Lightning MVP ICON. Method Summary. Biocontrol system. 2015; 1-4.
 44. López Tévez, Leonor; Torres, Carola *Microbiología General: Medios de Cultivo*. 2006, 1-4.
 45. Love R.M. *Enterococcus faecalis*—A mechanism for its role in endodontic failure. *Int. Endod. J.* 2001;34:399–405.
 46. Magic-Knezev A, van der Kooij D. Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Res* 2004;38:3971–3979.
 47. Meire, M. A., Coenye, T., Nelis, H. J., and De Moor, R. J. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int. Endod. J.* 2012; 45, 482–491
 48. Mohammadi Z, Shalavi S, Jafarzadeh H. Ethylenediaminetetraacetic acid in endodontics *Eur J Dent*. 2013 ; 7(1): 135–142.
 49. Molander, A., Reit, C., Dahlen, G., and Kvist, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int. Endod. J.* 1998. 31, 1–7.
 50. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966;74(5):1–380.
 51. Mondragón Herrera G. Bioluminiscencia en el control de higiene 2010. Enfásis. 1-4
 52. Mumford J. Pain perception threshold on stimulating human teeth and the histological condition of the pulp, *Br Dent J* 1967, 123:427.
 53. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Olken R. *Manual of clinical microbiology* 1999; 7.
 54. MVPICON USER GUIDE. Laboratories Humeau. France. 2012; 1-87.
 55. Nair P. On the causes of persistent apical periodontitis, a review. *Int Endod J*. 2006;39:249–81.
 56. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010;13(4):233-9.
 57. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan A, Yan A, y Cheung G. Biofilms in Endodontics Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(8): 1748.
 58. Nicolás Antonio Di Lalla . *Luminometría y ATP*. 2014
 59. Oppenheimer-Shaanan, Y., Steinberg, N., and Kolodkin-Gal, I. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. *Trends Microbiol*. 2013; 21, 594–601
 60. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy: an experimental histologic study. *Acta Odontol Scand* 1961;19:324–53.
 61. Ozdemir H.O., Buzoglu H.D., Calt S., Stabholz A., Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: In vitro study. *J. Endod*. 2010;36:842–846
 62. Paganelli, F. L., Willems, R. J., and Leavis, H. L. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? *Trends Microbiol*. 2012; 20, 40–49.
 63. Paque F, Balmer M, Attin T, Peters OA. Preparation of oval-shaped root canals in

- mandibular molars using nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomography study. *J Endod* 2010;36:703–7.
64. Paqué F, Ganahl D, Peters OA. Effects of root canal preparation on apical geometry assessed by microcomputed tomography, *Int Endod J*. 2005; 38:8
 65. Peters OA, Peters CI, Schönenberger K, Barbakow F. 2003. ProTaper rotary root canal preparation: effects of canal anatomy on final shape analysed by micro CT. *Int Endod J*. 36(2):86–92.
 66. Plotino G, Costanzo A, Grande NM, Petrovic R, Testarelli L, Gambarini G. Experimental Evaluation on the Influence of Autoclave Sterilization on the Cyclic Fatigue of New Nickel-Titanium Rotary Instruments, *J Endod*, 2012; 38 (2): 222-225
 67. Rebeiro AC, Matarazzo F, Faveri M. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16srRNA, *J Endod* 2011; 37:922.
 68. Ricucci D, Siqueira J: Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings, *J Endod* 2008, 36:1277.
 69. Roda, A.; Pasini, P.; Mirasoli, M.; Michelini, E. & M. Guardigli. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends in Biotechnology* 2004; 22, 295-303.
 70. Rosen E, Tsesis I, Elbahary S, Storzi N, Kolodkin-Gal I. Eradication of *Enterococcus faecalis* Biofilms on Human Dentin. *Front Microbiol*. 2016 26(7):2055.
 71. Rosenow EC. Studies on elective localization. *J Dent Research* 1919; 1:205-49.
 72. Sánchez, M, Llama-Palacios, A., Marín, M. J., Figuero, E., León, R., Blanc, V., Sanz, M. Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 2013 18(1):86–92.
 73. Sato T, Yamaki K, Ishida N, “Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals,” *International Journal of Dentistry*, 2012; 5:609-689.
 74. Sato T, Yamaki K, Ishida N, Shoji M, Sato E, Abiko Y, Hashimoto K, Takeuchi Y, Matsuyama J, Shimauchi H, et al. Rapid quantification of bacteria in infected root canals using fluorescence reagents and a membrane filter: a pilot study on its clinical application to the evaluation of the outcomes of endodontic treatment. *Int. J Dent*. 2012 ;(17)29-35.
 75. Schäfer E, Erler M, Dammaschke T. 2006. Comparative study on the shaping ability and cleaning efficiency of rotary Mtwo instruments. Part 2. Cleaning effectiveness and shaping ability in severely curved root canals of extracted teeth. *Int Endod J*. 39: 203–12.
 76. Shlezinger, M., Houri-Haddad, Y., Copenhagen-Glazer, S., Resch, G., Que, Y. A., Beyth, S. Phage therapy: a new horizon in the antibacterial treatment of oral pathogens. *Curr. Top. Med. Chem*. 2016;17(10): 1199 – 1211
 77. Simon R.J, Tomson P, and Berdal A, Regenerative Endodontics: Regeneration or Repair? *JOE*, 2014; 40(4S):S70-S75.
 78. Siqueira JF Jr, Rôcas IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:363–370.
 79. Siqueira JF Jr, Rôcas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*

- 2009; 88:969–981.
80. Siqueira JF, Rôças I. Microbiología y tratamiento de las infecciones endodónticas. Cohen: Vías de la Pulpa 10 ed. 2011 (15):567-569
 81. Tan K, Yu S, Quah S, Bergenholtz G. Rapid method for the detection of root canal bacteria in endodontic therapy. J Endod. 2015 Apr;41(4):447-50.
 82. Tay, C. X., Quah, S. Y., Lui, J. N., Yu, V. S., and Tan, K. S. (2015). Matrix metalloproteinase inhibitor as an antimicrobial agent to eradicate *Enterococcus faecalis* biofilm. J. Endod. 41, 858–863.
 83. Torabinejad M, Ung B, Kettering J. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. J Endod. 1990; 16:566–9.
 84. Torabinejad M, Walton R, 2010. Endodoncia: Principios y Práctica 4º. Elsevier Saunders España.
 85. Torabinejad, M, Walton, R. 2010. Endodoncia: Principios y Práctica. Elsevier Saunders 4º edición.
 86. Tronstad L, Sunde P, The evolving new understanding of endodontic infections, Endod Topics; 2003; 6:57.
 87. Trope M. 2003. The vital tooth: its importance in the study and practice of endodontics, Endod Topics. 5:1
 88. Varela-Patiño P, Ibañez-Párraga A, Rivas-Mundiña B, Cantatore G, Otero XL, Martín-Biedma B. Alternating *versus* continuous rotation: a comparative study of the effect on instrument life. J Endod. 2010; 36:157–159.
 89. Venkateswaran, K.; Hattori, N.; La Duc, M.T. & Kern, R. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. Journal of Microbiological Methods. 2003.52 (3), 367-377.
 90. Venkateswaran, K.; Hattori, N.; La Duc, M.T. & Kern, R. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. Journal of Microbiological Methods. 2003 52(3), 367-377.
 91. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. J Endod. 2012 Aug;38(8):1040-52.
 92. Von Arx T. Apical surgery: A review of current techniques and outcome. *Saudi Dent J.* 2011; 23(1): 9-15.
 93. Von der Fehr FR, Nygaard-Ostby B. Effect of EDTAC and sulfuric acid on root canal dentine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1963;16:199–205.
 94. Wang J., Jiang Y., Chen W., Zhu C., Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. J. Endod. 2012; 38:954–959.
 95. Witton R, Henthorn K, Ethunandan M, Harmer S, Brennan PA Neurological complications following extrusion of sodium hypochlorite solution during root canal treatment Int Endod J. 2005 Nov; 38(11):843-8.
 96. Yamazaki AK, Moura-Netto C, Salgado RJ, Kleine Bm, Prokopowitsch I. Ex vivo analysis of root canal cleaning using Endo-PTC associated to NaOCl and different irrigant solutions. Braz Oral Res. 2010; 24(1):15-20.
 97. Yang SE, Bae KS. Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root canals. J Endod, 2002, 433-7.
 98. Yu C, Abbott P. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. Aust Dent J. 2007; 52(1):S4-16.

99. Zapata, R. O., Bramante, C. M., De Moraes, I. G., Bernardineli, N., Gasparoto, T. H., Graeff, M. S., Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *J. Endod.* 2008; 34, 1198–1201.
100. Zhang C., Du J., Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J. Endod.* 2015, 41 1207–1213.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Marisol Elizabeth Bulnes García

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Tesis: “COMPARACIÓN DE UN MÉTODO INMEDIATO PARA DETECTAR BACTERIAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE ENDODONCIA VERSUS EL MÉTODO DE CULTIVO TRADICIONAL”.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 31 de Mayo de 1990, hija de Bernardo Bulnes García y Elizabeth Trinidad García Hilton, esposa de José Eduardo Santos González.

Educación: Egresado de la Universidad de Monterrey grado obtenido Médico Cirujano Dentista en 2103 con mención honorífica, y mención CUM LAUDE.